

옥수수 불검화 추출물(Zea Mays L.)과 후박(Magnoliae cortex) 추출물 혼합물의 치주질환원인균에 대한 항균작용 및 치은섬유아세포 활성화도에 미치는 영향

김태일¹ · 최은정² · 정종평¹ · 한수부¹ · 구 영¹

서울대학교 치과대학 치주과학교실¹, 을지의과대학교 치과학교실²

I. 서론

치주질환은 일반적으로 치태 내 치주병원균에 의한 감염성 질환으로, 만성염증에 의한 치주조직 파괴, 특히 치조골 파괴를 보이며 치아상실을 일으키게 된다.

치주질환치료의 보조제로서는 항생제와 항균제 및 항염제로 크게 나눌 수 있는데, 항생제는 내성균 발현, 과민반응 및 위장장애 등의 부작용을 가지고 있다⁴⁾.

NSAID 약제들로 대표되는 항염제는 PGE₂의 생성을 억제하여 염증을 억제하고, Phenolic compound, Quaternary ammonium compound, Bisbiguanide 등의 항균제들은 일정 정도의 치태억제 및 항균효과를 보이고 있지만^{1,2)}, 치아의 표면착색, 박리성 치은염 유발, 점막의 과민증 등의 문제점이 있다^{3,4)}.

이러한 부작용을 극복하기 위한 방법으로서는 생약제제에 대한 연구가 이루어져 왔는데, 동양의학에서 오랜 기간 사용되어 온 약제들로 화학제제들이 가지는 부작용을 보완할 수 있는 제제로 기대되었기 때문이다.

현재까지 치주질환과 관련하여 연구되어진 생약제제들 가운데, 옥수수 불검화 추출물은 치주 농루 및 치주염 치료를 위시한 많은 생물학적 기능개선에 효과가 있다고 보고되었고⁵⁻¹¹⁾, 후박 추출물은 S.mutans에 대한 항균효과^{12,13)}를 위시한 다양한 세균에 대한 항균,항염효과가 관찰되었다^{14,15)}.

최근에는 혼합 생약제제에 대한 연구가 계속되고 있는데,이것은 생약제제가 가지는 안전성과 더불어 각 약제가 지니는 약리 효과를 높이기 위한 시도라 볼 수 있다^{16-18,20,21)}.

본 연구의 목적은 전술한 생약제제 중 생물학적인 효능을 나타내는 옥수수 불검화 추출물과 항균작용을 보이는 후박 추출물의 혼합물을 다양한 혼합비로 제조한 후, 치주 질환원인균에 대한 항균반응과 치은섬유아 세포의 활성화도에 미치는 효과를 측정하여 혼합약제가 치주염 치료제로서 사용하기 위한 기본적인 효능을 지니고 있는지를 평가하는데 있다.

II. 대상 및 방법

1. 생약제제의 준비

* 이 연구는 1996년도 서울대학교병원 지정연구비(02-1996-281-0)지원에 의한 결과임

교신 저자: 구 영, 서울특별시 종로구 연건동 28 서울대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 110-749

1) 옥수수 불검화 추출물

옥수수 기름 1kg에 n-hexane 10 L, 5% 가성소다 용액 0.68 L를 첨가한 후 55°C 에서 3시간 환류시켰다. 생성되는 두 층의 물질 중 수층을 제거하고 남은 잔사를 가지고 상기한 조작을 2회 반복하여 옥수수 불검화 추출물을 얻었다.

2) 후박 추출물

후박(Magnolia Officinalis L.) 500g 을 세절하여 75% 에탄올 3L를 가한후 60°C의 수욕에서 2시간 추출하고 냉각하여 여과액을 얻었다. 이 때 남은 잔사에 상기한 조작을 반복하여 2차 여과액을 얻고, 1,2 차 여과액을 합하여 감압농축하여 후박 추출물을 얻었다.

3) 혼합물의 제조

옥수수 불검화 추출물과 후박 추출물을 각각 0.4% 농도의 수용액으로 만든 후 옥수수 불검화 추출물과 후박 추출물을 0.5:1, 1:1, 1.5:1, 2:1의 중량비로 혼합하여 실험에 이용하였다.

2. 항균 효과 실험

Prevotella intermedia, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans* 등 4종의 치주질환세균을 대상으로 하여, 상기한 방법으로 준비된 생약제제의 항균반응을 검정하였는데, 구체적인 절차는 다음과 같았다. 리터당 tryptone 17g, yeast extract 3g, glucose 2.5g, NaCl 5g, K₂SO₄ 2.5g, sodium thioglycolate 0.5g, hemin 5ml, menadion 0.5g, bacto agar 12g 등을 혼합하여 평판배지를 제작한 후, 상기한 4종의 세균을 도말하고 직경 9mm의 팁을 세우고 위의 혼합 배지액을 다시 부어 균한 후 직경 9mm 높이 5mm 정도의 홈을 만들어 상기한 생약제제를 200 μl씩 적용하였다. 37°C 조건의 혐기성 배양기 및 CO₂ 배양기에서 3-7일간 배양하였다. 그 후, vernier caliper를 사용하여 세균성장억제부위의 직경을 측정하여 면적(mm²)을 산출하였다.

3. 치은 섬유아세포 활성화 실험

1) 치은 섬유아세포 배양

구강위생술식을 실시한 후, 교정환자의 발치대상 치인 제1소구치의 치간 치은부위에 내사면 절제를 가하고 정상치은조직을 채취하였다. 이 조직편을 100U/ml Penicillin과 100 μg/ml Streptomycin 및 10% FBS 가 첨가된 α-MEM 에 넣고 배양을 시행하였으며, 3일 간격으로 배양액을 교환해주면서 습도 95%, 온도 37°C, 95% 공기와 5% CO₂가 공급되는 환경에서 5세대 배양시켰다.

2) 치은 섬유아세포 활성화 측정실험

배양된 치은 섬유아세포를 0.25% Trypsin- EDTA 용액으로 처리후 원심분리하여 배양액 으로부터 세포부유액을 만들고 96well tissue culture plate를 준비한 후, 표준 혈구계산기로 well당 1 X 10⁵ 개의 세포수가 되게 집중하였다. 각각의 well에 해당되는 생약제제를 20 μl씩 넣고 배양액을 180 μl씩 넣었다. 이들을 습도 95%, 온도 37°C, 95% 공기와 5% CO₂가 공급되는 환경에서 24시간 배양한 후 생리식염수에 용해한 MTT 용액 50 μl를 각 well에 넣고 1시간 동안 배양 하였다. MTT 용액을 제거하고 DMSO를 각 well에 50 μl씩 첨가하고 plate를 잘 흔든후 ELISA reader(Thremomax , Molecular Device Co., USA)로 570nm 에서 흡광도를 측정 하였다. 대조군으로는 매 실험마다 생약 제제가 들어있지 않은 α-MEM 용액이 loading 된 well을 이용하였다. 이 같은 실험을 각각 3회 반복하였고, 얻어진 수치는 대조군에 대한 백분율로 계산하여 세포활성도를 비교하였다.

4. 통계분석

각각의 실험은 3회씩 반복되었으며(n=3), 통계프로그램 SPSS® version 11 를 사용하여 각 생약제제별 측정결과를 one-way ANOVA test를 실시하였는데, 유의수준(α)은 0.05로 설정하고, 사후분석은 Tukey 법 으로 검정하였다.

III. 연구결과

1. 항균 반응

Prevotella intermedia, *Actinobacillus actinomycesmcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*,

Streptococcus mutans 4종의 치주질환 원인균에 생약 제제를 적용한 결과, ZML추출물만을 투여하였을 경우 제일 적은 세균성장억제면적을 보였고, 후박추출물만을 투여한 군에서 제일 큰 세균성장 억제 면적을 나타내었다. 그러나 ZML과 후박 추출물의 혼합약 제투여시, 혼합비 2:1, 1.5:1, 1:1, 0.5:1 의 비율로 갈수

Table 1. Antimicrobial effect to *P.i*.

Groups	Inhibitory area (mm ²) (mean ± SD)
ZML	259.53 ± 3.92
Magnolia	546.13 ± 13.08*
Z:M(2:1)	394.70 ± 11.83
Z:M(1.5:1)	413.47 ± 11.01
Z:M(1:1)	478.47 ± 17.12
:M(0.5:1)	535.87 ± 9.62*

* statistically significant among other groups ($\alpha = 0.05$)

Table 2. Antimicrobial effect to *A.a*.

Groups	Inhibitory area (mm ²) (mean ± SD)
ZML	206.57 ± 3.86
Magnolia	451.63 ± 3.72*
Z:M(2:1)	282.70 ± 8.75
Z:M(1.5:1)	336.70 ± 20.34
Z:M(1:1)	405.13 ± 12.19
Z:M(0.5:1)	445.37 ± 12.68*

* statistically significant among other groups ($\alpha = 0.05$)

Table 3. Antimicrobial effect to *P.g*.

Groups	Inhibitory area (mm ²) (mean ± SD)
ZML	185.10 ± 9.49
Magnolia	577.00 ± 11.75*
Z:M(2:1)	324.70 ± 33.43
Z:M(1.5:1)	332.20 ± 10.59
Z:M(1:1)	446.20 ± 15.80
Z:M(0.5:1)	534.60 ± 18.56*

* statistically significant among other groups ($\alpha = 0.05$)

Table 4. Antimicrobial effect to *S.m*.

Groups	Inhibitory area (mm ²) (mean ± SD)
ZML	147.47 ± 7.90
Magnolia	351.77 ± 7.75*
Z:M(2:1)	183.20 ± 9.31
Z:M(1.5:1)	211.40 ± 8.50
Z:M(1:1)	302.90 ± 10.92
Z:M(0.5:1)	338.00 ± 16.32*

* statistically significant among other groups ($\alpha = 0.05$)

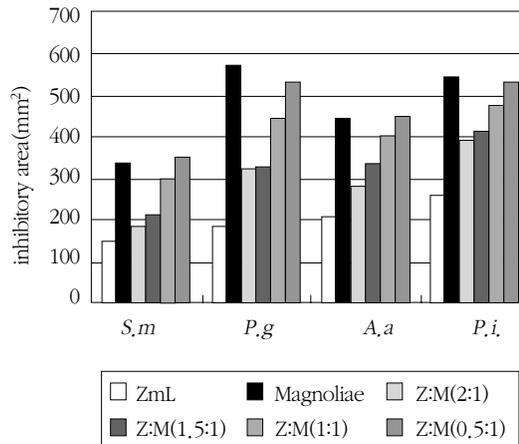


Figure 1. Antimicrobial effects to periodontal pathogens

록 세균의 성장억제면적이 증가하였다(Table 1~4). 특히, 0.5:1의 혼합약제균에서의 세균억제 면적이 후박추출물 단독사용균에서의 세균 억제면적과 비근한 수치를 보였는데, 통계 분석결과 후박추출물 단독투여균과 0.5:1 (ZML:후박추출물) 혼합제제균이 다른 군과 비교하여 유의성있는 결과를 보였으며, 두 군간에는 통계학적 유의성이 없었다(Figure 1).

2. 치은 섬유아세포 활성화

대조군의 수치를 100%로 환산하였을 때, 옥수수 불검화 추출물은 126.57%, 후박 추출물은 125.03%의 세포 활성도를 보였다. 혼합물은 각각의 추출물을 단독으로 사용했을 때 보다 높은 세포활성도를 나타내었는데, 옥수수 불검화 추출물과 후박 추출물

Table 5. Results of cellular activity (%)

Groups	Cellular activity (%) (mean±SD)
ZML	126.57±5.37
Magnolia	125.03±4.24
Z:M(2:1)	128.37±5.27
Z:M(1.5:1)	135.07±3.23
Z:M(1:1)	136.97±1.72
Z:M(0.5:1)	144.90±2.52*

* statistically significant among other groups ($\alpha = 0.05$)

의 혼합비 2:1, 1.5:1, 1:1, 0.5:1 에서 각각 128.37%, 135.07%, 136.97%, 144.90%의 세포활성도를 나타내었으며, 혼합비 0.5:1의 생약제제가 다른 군에 비해서 통계적으로 유의성있는 차이를 보였다(Table 5). 대조군에 비교한 세포 활성도 증가율은 혼합비 0.5:1의 혼합물에서 44.90%로 혼합물 중 가장 높은 세포 활성도를 보였다(Figure 2).

IV. 고찰

옥수수 불검화 추출물은 여러 염증성 질환에 대한 효과를 보기위한 과정 중 우연히 치주농루 및 치주염에 대해 효과가 발견된 후, 치아동요도 감소, 치주낭 깊이 감소, 치은 출혈감소 및 조골기능의 활성화 등이 보고되었다^{19,22,23,24}). 그러나, 기계적인 치주치료술식과 함께 병행한 연구였기에 자체적인 효능에 대해서는 의문이 제기되는 경우도 있다.

후박 추출물은 *Streptococcus mutans* 와 치태 내 세균에 대해 효과적인 항균효과를 가지고 있음이 1970년대부터 보고되었다. 항균효과면에 있어서, 후박 추출물은 tetracycline 및 chlorhexidine보다는 약하지만 listerine 보다 효과적이며, 다른 생약제제에 비해서는 월등한 항균효과를 나타낸다는 보고가 있었다^{4,15}). 세포독성 측면에서도, chlorhexidine이 지니는 세포 독성에 비해 현저히 낮은 세포독성을 보

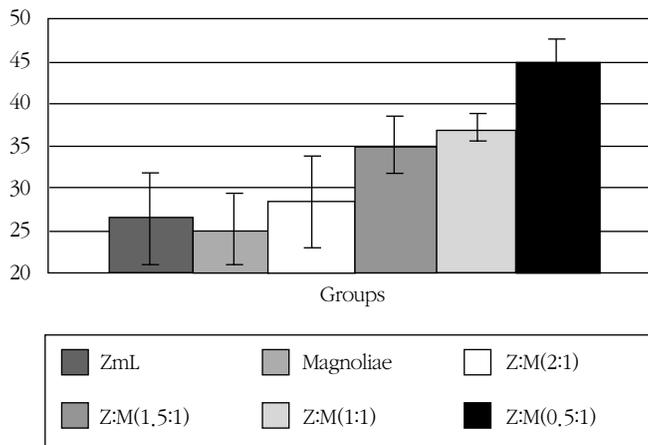


Figure 2. Cellular activity increasing rate (%)

인다고 보고되었다. 본 연구는 상기한 생물학적 활성기능을 지니는 옥수수 불검화 추출물과 항균작용을 지니는 후박 추출물을 혼합하여, 두 가지 생약제제가 가진 장점의 효과적인 상승작용을 보고자 하였다. 항균효과측면에서 볼 때, 후박추출물이 지니는 항균반응에 비하여 혼합물(옥수수불검화추출물:후박추출물)의 비율이 2:1, 1.5:1, 1:1, 0.5:1로 갈수록 후박추출물의 항균효과와 비슷한 효과를 지니는 결과를 나타내었다. 혼합비 0.5:1 혼합제제군과 후박추출물 단독군이 다른 군에 비해 통계학적으로 유의성있는 항균력을 나타내었는데, 이 두 군간에는 통계적인 유의성이 보이지 않았으므로, 0.5:1 혼합 약제군이 후박추출물 단독군과 동등한 항균력을 가진다고 유추할 수 있었다.

한편, 세포독성 정도를 평가하기 위한 세포 활성도 검사에서는 혼합약제가 옥수수 불검화 추출물 또는 후박 추출물이 단독으로 사용되었을 때에 비해 높은 세포 활성도를 나타내었는데, 이러한 결과는 두 가지 생약제제가 상승 작용을 일으켰기 때문으로 여겨지며, 혼합비 0.5:1(옥수수 불검화 추출물:후박추출물)에서 현저한 결과가 나타난 것으로 보아, 이 혼합비에서 상승작용이 극대화되었다고 볼 수 있다.

본 실험의 결과, 옥수수 불검화 추출물과 후박 추출물의 0.5:1 혼합비의 혼합약제가 항균작용을 보유하면서 동시에 세포독성을 보이지 않는 안전한 약제가 될 수있음을 확인할 수 있었다.

V. 결론

1. 옥수수 불검화 추출물과 후박 추출물의 혼합물은 비율이 2:1, 1.5:1, 1:1, 0.5:1로 갈수록 후박추출물의 항균효과와 비슷한 효과를 지니는 결과를 나타내었다.
2. 옥수수 불검화 추출물과 후박 추출물의 혼합물은 각각의 단독약제보다 높은 세포 활성도를 보였다.
3. 옥수수 불검화 추출물과 후박 추출물의 혼합물 중 0.5:1의 비율로 조성된 혼합물에서 상승효과가 가장 뚜렷하게 나타났다.

4. 0.5:1 (옥수수 불검화 추출물:후박 추출물) 혼합비로 조성된 혼합물이 치주 조직세포에 독성을 나타내지 않고 효과적으로 치주질환원인균을 억제하는 것으로 미루어 볼 때, 치주치료 보조제로서의 적용 가능성을 확인할 수 있었다.

VI. 참고문헌

1. Loe H.,Schiott CR.: The effect of mouth rinses and topical application of Chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodont Res* 5:79-83,1970
2. Smith RN,Andersen RN, Kolenbrander PE: Inhibition of intergeneric coaggregation among oral bacteria by cetylpyridium chloride, chlorhexidine digluconate and octenidine dihydrochloride. *J Periodont Res* 26:422- 428,1991
3. Helgeland K,Heyden G,Rolla G : Effect of chlorhexidine on animal cells in vitro. *Scan J Dent Res* 79:209-215, 1971
4. Pucher JJ,Daniel JC: The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *J Periodont* 62: 526-532,1993
5. Thiers H,Jouanneteau,Zwingelstein: The maize germ oil insaponifiable. Its therapeutic indications. *Presse Medico-cale* 66:1293,1958
6. Chaput A: Insadol and parodontolyses. *L'Intormation Dentaire* 23: 2148,1964
7. Tecucianu J: Double blind clinical trial of titrated extract of the unsaponifiable fractions of Zea Mays L. on gingival inflammation. *Inf. Den* 57:27, 1975
8. Son S: Influence of standard extract of the unsaponifiable fraction of Zea Mays L. on periodontal disease. *Quintessence international* 8:1,1982
9. Scopp IW, Kumar W,Kasseuny DY, Ozick J: Corn-germ oil extracts in the treatment of periodontal disease. *Minerva Stomat*, 20:88-93, 1971

10. Fourel J, Siau T, Barka A: Clinical trials of the unsaponifiable part of Maize seed oil in periodontic practice. *L'Information Dentaire* 8:749-753,1967
11. Colombel J, Parente C: Trial of the unsaponifiable fraction of Zea Mays L. on dryness of the mouth induced by psychotropic drugs. *Progres Odontostomatologiques* 12:31-33,1974
12. Namba T, Tsunozuka M, Bae K, Hattori M.: Studies on dental caries prevention by traditional Chinese medicine (part I). Screening of crude drug for anti-bacterial action against streptococcus mutans. *Shoyakugaku Zasshi* 35, 1981
13. Bae K, Oh H: Synergistic effect of lysozyme on bactericidal activity of Magnolol and honokiol against a cariogenic bacterium, Streptococcus mutans OMZ 176. *Arch Pharmacies* 13: 117,1990
14. Chang BS, Son SH, Chung CP, Bae KH: The effects of honokiol and magnolol on the antimicrobial, bacterial collagenase activity, cytotoxicity and cytokine production. *J Korean Acad Periodont* 23: 145-158,1993
15. 이승렬, 정종평, 최상목, 배기환: 천연물 추출물의 치주병인균에 대한 항균효과 및 세포독성에 관한 연구. *대한치주과 학회지* 22:515-526, 1992
16. 이용무, 구영, 배기환, 정종평: 후박 및 대조 추출혼합물이 골조직 재생에 미치는 영향. *대한치주과 학회지* 27(1): 165- 177, 1997
17. 신승윤, 이용무, 구영, 배기환, 정종평: 후박 및 홍화종자 추출혼합물이 치주 인대세포 및 골아세포의 활성화 및 백서의 두개골재생에 미치는 영향. *대한치주 과학회지* 28: 545-557,1998
18. 정종평, 구영, 배기환: 후박 및 은행엽 추출물의 항균, 항염 및 세포활성도에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 25: 478- 486, 1995
19. 정종평, 구영, 배기환 : 은행엽 추출물이 치은섬유아세포에 미치는 생물학적 영향. *대한치주과학회지* 25:469-477,1995
20. 김태일, 염혜리, 류인철, 배기환, 정종평: 후박 및 은행엽 추출물을 함유한 치약의 임상 및 미생물학적 효과에 관한 연구. *대한치주과학회지* 26:542-556,1996
21. Shin SY, Lee YM, Ku Y, Ryu IC, Han SB, Choi SM, Bae KH, Chung CP: Effects of Magnoliae cortex and Zizyphi fructus extract mixtures on the progression of experimental periodontitis in Beagle dogs. *J Korean Acad Periodont* 29: 289-296,1999
22. 이승렬, 정종평, 최상목, 배기환: 천연물 추출물의 치주병인균에 대한 항균효과 및 세포독성에 관한 연구. *대한치주과 학회지* 22: 515-526, 1992
23. Goldschmidt P, Cogen R, Taubman S: Cytopathologic effects of chlorhexidine on human cells. *J Periodontol* 48:212- 215,1977
24. 김종관, 채중규, 조규성, 문익상, 최성호: Zea Mays L. 불검화 정량추출물의 치주염 치료 효과에 대한 임상적 연구. *대한 치주과학회지* 21(2): 225-234,1991
25. 민원기, 이만섭: Ascorbic acid와 Zea Mays L. 불검화 정량추출물이 치주염 치유에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. *대한치주과학회지* 18(2):6-23,1988

Antimicrobial effect of Zea Mays L. and Magnoliae cortex extract mixtures on periodontal pathogen and effect on human gingival fibroblast cellular activity

Tae-Il Kim¹, Eun-Jeong Choi², Chong-Pyoung Chung¹, Soo-Boo Han¹, Young Ku¹

¹Department of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University

²Department of Dentistry, School of Medicine, Eulji University

Zea Mays L. has been known to be effective for improving tissue health and Magnoliae cortex to have effective antibacterial and antimicrobial activity against pathogenic microbes. The purpose of this study was to examine the antimicrobial effects of Zea Mays L. and Magnoliae cortex extract mixtures on periodontal pathogens (*Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans*) and to examine the effects on human gingival fibroblast cellular activity.

Zea Mays L. and Magnoliae cortex extracts and their mixtures were prepared with various mixing ratios (0.5:1, 1:1, 1.5:1, 2:1). These extracts were loaded to periodontal pathogen cultured petri dish for antimicrobial test and also loaded to cultured human gingival fibroblast for cellular activity test. Each test was repeated 3 times and data were analyzed by one-way ANOVA with 95% confidence level.

Mixture of these two extracts showed greater amount of inhibition area on periodontal pathogen and more improved gingival fibroblast activity as Zea Mays L. ratio reduced. So, mixture ratio 0.5:1 (Zea Mays L. : Magnoliae cortex) group showed statistical significance in antimicrobial activity and cellular activity among various mixtures ($p < 0.05$).

In conclusion, 0.5:1 (Zea Mays L. : Magnoliae cortex) mixture possessed best gingival fibroblast cellular activity and antimicrobial activity toward periodontal pathogens.